

DIE ABHÄNGIGKEIT
DER HARNKALLIKREINAUSSCHIEDUNG
VON AUSGEWÄHLTEN
DEN KREISLAUF UND
ELEKTROLYT-WASSER-HAUSHALT
BEEINFLUSSENDEN WIRKSTOFFEN

Dr.med.Wilhelm Blech

1975

AUS DEM INSTITUT FÜR KLINISCHE CHEMIE
UND KLINISCHE BIOCHEMIE
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstand: Prof. Dr. Dr. E. WERLE

DIE ABHÄNGIGKEIT
DER HARNKALLIKREINAUSSCHIEDUNG
VON AUSGEWÄHLTEN
DEN KREISLAUF UND
ELEKTROLYT-WASSER-HAUSHALT
BEEINFLUSSENDEN WIRKSTOFFEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dr. med. Wilhelm Blech
aus München

München 1975

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof. Dr. Dr. E. WERLE
Dekan: Prof. Dr. W. SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 28.1.1975



INHALTS-VERZEICHNIS

Verzeichnis der Kapitel

1. Einleitung

1. Einleitung

2. Die Entwicklung der Sprache

1. Die Entwicklung der Sprache

2. Die Entwicklung

3. Die Entwicklung

4. Die Entwicklung

5. Die Entwicklung

2. Die Entwicklung

MEINER FRAU EDITH

3. Die Entwicklung

1. Die Entwicklung

2. Die Entwicklung

3. Die Entwicklung

4. Die Entwicklung

4. Die Entwicklung

1. Die Entwicklung

2. Die Entwicklung

3. Die Entwicklung

4. Die Entwicklung

5. Die Entwicklung

6. Die Entwicklung

5. Die Entwicklung

1. Die Entwicklung

2. Die Entwicklung

3. Die Entwicklung

4. Die Entwicklung

5. Die Entwicklung

6. Die Entwicklung

7. Die Entwicklung

8. Die Entwicklung



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551923_0096

INHALTSVERZEICHNIS

A	EINFÜHRUNG	7
I	Geschichtlicher Überblick	7
II	Das Kallikrein-Kinin-System	8
	1. Zur Spezifität des Kallikreins	8
	2. Zur Physiologie	10
	3. Zur Chemie	12
	4. Zur Pharmakologie	14
	5. Zur Pathologie	14
III	Problemstellung	16
B	EXPERIMENTELLER TEIL	18
I	Definition der Einheiten	18
	1. Enzymatische Kallikreineinheit	18
	2. Biologische Kallikreineinheit	18
	3. Inhibitor-Einheiten	19
II	Bestimmungsmethoden	20
	1. Spektrophotometrische Bestimmung des Harnkallikreins	20
	a) Reagenzien	20
	b) Durchführung	21
	c) Berechnung	22
	2. Biologische Bestimmung des Harnkallikreins	23
III	Tierversuche	24
	1. Versuch mit Spironolacton	24
	2. Versuch mit Propranolol	26
	3. Versuch mit Östrogen	28
	4. Natriumfütterungsversuche	29
	a) Versuch mit natriumarmer Diät	29
	b) Versuch mit "natriumreicher" Diät	30
	5. Erläuterung zur statistischen Überprüfung der Ergebnisse	30
C	ERGEBNISSE	32

I	Versuch mit Spironolacton	32
	1. Meßergebnis	32
	2. Statistische Überprüfung	34
II	Versuch mit Propranolol	35
	1. Meßergebnis	35
	2. Statistische Überprüfung	36
III	Versuch mit Östrogen	38
	1. Meßergebnis	38
	2. Statistische Überprüfung	39
IVa	Versuch mit natriumarmer Diät	40
	1. Meßergebnis	40
	2. Statistische Überprüfung	41
IVb	Versuch mit "natriumreicher" Diät	43
	1. Meßergebnis	43
	2. Statistische Überprüfung	44
D	DISKUSSION	45
E	ZUSAMMENFASSUNG	52
F	LITERATURVERZEICHNIS	53

A EINFÜHRUNG

I GESCHICHTLICHER ÜBERBLICK

Beobachtungen, daß Harninjektionen in die Blutbahn einen Blutdruckabfall zur Folge haben, liegen schon aus den Jahren 1909 (ABELOUS und BARDIER) bzw. 1920 (PRIBRAM und HERRNHEISER) vor.

Im Jahre 1925 fand FREY im Urin eine hochmolekulare blutdrucksenkende Substanz, die später vermehrt im Pankreas nachgewiesen werden konnte und deshalb nach dem griechischen Synonym Kallikreas für Pankreas die Bezeichnung Kallikrein erhielt.

Den pharmakologischen Wirkmechanismus des Kallikreins zu klären, war WERLE (1937) vorbehalten. Er fand, daß Kallikrein seine Aktivität durch enzymatische Spaltung eines Plasmaglobulins, des Kininogens, entfaltet, wobei ein wirksames Polypeptid freigesetzt wird, das Kallidin (15).

Mit der Darstellung des Bradykinins wurde ein weiteres wichtiges Kinin aufgedeckt, das zunächst mit dem Kallidin identisch zu sein schien. WERLE (1950) wies für beide Substanzen das gleiche Plasmasubstrat nach; die unterschiedliche Kettenlänge der Moleküle wurde dann 1960 von WERLE für Kallidin und ELLIOT für Bradykinin erkannt. ELLIOT

(1960) identifizierte auch das Methionylkallidin durch Behandlung von Blutplasma mit schwacher Säure (56).

Die Kenntnisse über das Kininogenasen-Inhibitoren-System gehen schließlich auf die Arbeit von FREY, KRAUT und WERLE aus dem Jahre 1950 zurück. WERLE entdeckte im Jahre 1929 in Lymphdrüsen und Ohrspeicheldrüsen einen niedermolekularen Hemmstoff für Kallikrein, der später unter der Bezeichnung Trasylol^R Eingang in die Therapie fand (16).

II DAS KALLIKREIN-KININ-SYSTEM

1. Zur Spezifität des Kallikreins

Kallikrein kommt im Pankreas, in den Mundspeicheldrüsen, in der Darmwand, in der Niere, im Myometrium, im Plazentagewebe, in der Amnionsflüssigkeit und im Blutplasma vor, nach LEWIS und MATTEWS (1968) praktisch in allen exokrinen Drüsen und deren Sekreten (28). Endokrine Drüsen enthalten hingegen kein Kallikrein (50).

Die Bildung des Harnkallikreins erfolgt offenbar im proximalen Tubulusabschnitt. Dafür sprechen die Untersuchungen von VOGEL und WERLE (1960) sowie von DOBOVICNIK und FORELL (1961) mittels selektiver Schädigung der proximalen Nierentubuli. Es kann nicht dem Blutplasma entstammen, da in die A. renalis injiziertes Kinin nicht im Harn erscheint (9, 52).

Die tägliche Kallikreinausscheidung des Menschen weist mit Normwerten von 120 bis 320 KE eine erhebliche Schwankungsbreite auf (11).

Organkallikrein unterscheidet sich vom Plasmakallikrein dadurch, daß ersteres Kallidin, letzteres Bradykinin liberiert. Während nur in den Mundspeicheldrüsen und im Harn die aktive Form des Kallikreins vorliegt, handelt es sich bei den Organkallikreinen bzw. beim Plasmakallikrein um primär inaktive Formen, die sog. Präkallikreine. Plasma- und Organkallikrein sowie die Organkallikreine untereinander verhalten sich chemisch different (15, 28).

Die Abgrenzung des Kallikreins gegenüber anderen liberierenden Enzymen, wie Trypsin, Plasmin, Reptilienproteasen, Akrosin, ist eindeutig. Im Gegensatz zu diesen Substanzen greift Kallikrein nur ein einziges natürliches Substrat an, das Kininogen. Es wirkt somit als streng spezifische Endopeptidase (15).

In der Natur finden die Kinine eine interessante Verbreitung: Bei Säugetieren werden sie in Form des Kininogens im Plasma und in der interstitiellen Gewebsflüssigkeit gespeichert. Hochkonzentriert kommen freie Kinine in Insektengiften, z. B. bei Hornissen, Wespen, sowie in der Haut bestimmter Amphibien vor. Sie dienen bei Insekten wohl als Kampf- und Abwehrstoffe, bei Amphibien stehen sie möglicherweise auch im Dienst des Stoffaustausches im wässrigen Milieu (49).

2. Zur Physiologie

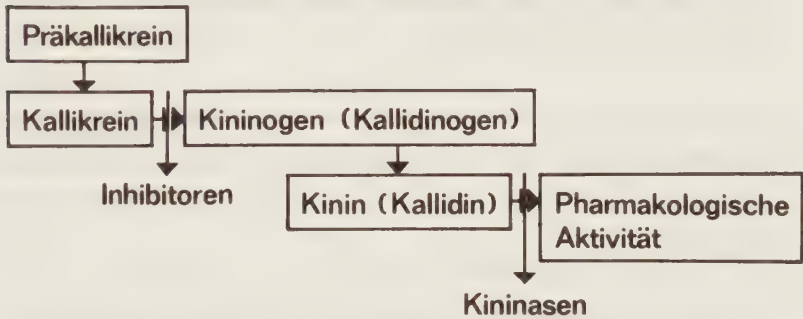
Den im Organismus weit verbreiteten Kallikreinen steht als einziges Plasmasubstrat das Kininogen gegenüber. Der wichtigste Bildungsort des Kininogens ist neben Lunge, Haut und Niere die Leber, wie RYAN und Mitarbeiter (1965) anhand von Durchströmungsversuchen mit radioaktiv markierten Substanzen nachweisen konnten (40).

Die Aktivierung von Plasma- und Pankreaspräkallikrein kann einerseits durch Trypsin erfolgen, andererseits kann Plasmapräkallikrein auch durch Kontakt von Plasma mit benetzbaren Oberflächen bzw. bei Gewebsverletzungen aktiviert werden. Hierfür zeichnet der Gerinnungsfaktor XII oder Hagemann-Faktor verantwortlich (27, 49). Aktives Kallikrein ist nun in der Lage, aus Kininogen das entsprechende Kinin freizusetzen. Der Nachweis der Kinine gelingt am isolierten Meer-schweinchendarm oder Rattenuterus, aber auch mit immunologischen Verfahren (16, 33).

Die Konzentration der aktiven Kinine im Blut ist nahezu unmeßbar gering, da sich unter physiologischen Bedingungen ein Fließgleichgewicht zwischen Aktivierung und Abbau einstellt. Für den raschen Abbau der Kinine sorgen sog. Kininasen, dies sind Karboxy- und Aminopeptidasen (53).

Im Plasma finden sich aber auch hochmolekulare Glukoproteine, die Kininogenasen, d.h. Kallikrein, direkt inhibieren. Es handelt sich dabei um drei verschiedene Kallikreininhibitoren, die zum Teil identisch sind mit den Trypsininhibitoren (50).

Eine Übersicht über das Kallikrein-Kinin-System erlaubt nachstehende Abbildung:



Zur Frage nach der physiologischen Aufgabe der Kinine müssen folgende Untersuchungen herangezogen werden:

- HILTON und LEWIS (1955) postulierten für die funktionelle Hyperämie der Speicheldrüsen die Kallidinfreisetzung aus dem Kininogen der interstitiellen Flüssigkeit (22).
- MORIWAKI (1972) wies das Eindringen von Kallikrein in die Gefäße der Darmschleimhaut mit Jod-131-markiertem Kallikrein nach; zugleich kam es zu einer beschleunigten Resorption von markiertem Valin in die Darmgefäße. Dies deutet auf einen Einfluß des Kallikreins auf Peristaltik und spezielle Resorptionsvorgänge hin (36).
- Aus dem Arbeitskreis um WERLE (1973) liegen Ergebnisse vor, die einen Anstieg der Nierendurchblutung und Diurese bei nieren-naher intraarterieller Kinininjektion zeigen. Dies läßt auf eine Beziehung des Kallikrein-Kinin-Systems zum Renin-Angiotensin-System schließen (25, 50).

- Aufgrund der Tatsache, daß bei wärmeinduzierter Vasodilatation im regionären Perfusat Bradykinin gefunden wurde, mißt GANONG (1972) den Kininen eine Bedeutung für die thermoregulatorische Kreislaufanpassung bei (17).
- Nach MELMON und Mitarbeiter (1968) werden beim Geburtsvorgang Kinine freigesetzt, ein Vorgang, der die Adaptation des Kreislaufs des Neugeborenen an das extrauterine Leben ermöglichen soll (34).
- Mit dem Nachweis der Kininliberierung durch den Hagemann-Faktor stellten ARMSTRONG und Mitarbeiter (1957) den Zusammenhang von Kallikrein-Kinin-System und Gerinnungssystem dar. Beziehungen bestehen auch zum Fibrinolyse- und Komplementsystem (2, 3, 43).

3. Zur Chemie

Am genauesten bekannt ist die Struktur des Kallikreins aus Schweinepankreas (18, 20). Es kommt in zwei Präenzymformen vor (A, B), die wiederum aus zwei Aminosäureketten mit quantitativ verschiedenem Kohlenhydratanteil bestehen. Der Kohlenhydratanteil setzt sich aus Fukose, Mannose, Galaktose, Glukosamin und Sialinsäure zusammen; er ist bei der B-Form höher.

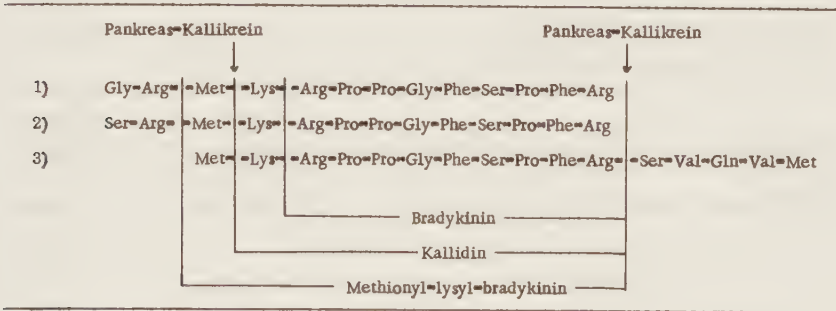
Das Molekulargewicht des Kallikreinproteins beträgt $24\,000 \pm 860$.

Kallikrein gehört zur Gruppe der Peptid-Peptidesterasen und wegen seines Serinrestes im aktiven Zentrum zu den sog. Serinenzymen, wie z. B. auch Trypsin. Durch Blockierung des aktiven Zentrums, etwa mit Diisopropylfluorophosphat, verlieren diese Enzyme ihre Wirksamkeit.

Das Kallikreinsubstrat, das Kininogen, gehört der α_2 -Globulinfraction des Plasmas an.

Die liberierten Kinine haben ein gemeinsames Grundgerüst aus neun Aminosäuren und unterscheiden sich nur bezüglich der endständigen Aminosäurereste.

Die Struktur der wirksamen Polypeptide sowie die Angriffspunkte des Pankreaskallikreins zeigt folgende Abbildung:



4. Zur Pharmakologie

In ihrer pharmakologischen Wirkung erinnern die Kinine an das Histamin, indem sie die Kapillaren erweitern, deren Permeabilität steigern und damit den Blutdruck senken, sowie Kontraktionen der glatten viszeralen Muskulatur verursachen können. Sie sind in der Lage, alle Zeichen der Entzündung hervorzurufen, insbesondere auch Leukozyten anzuziehen (17, 27).

Ihre außerordentliche schmerzerzeugende Wirkung wurde von ARMSTRONG und KEELE (1964) sowie von EISEN und VOGT (1970) beschrieben (10, 24).

Bei intraarterieller Verabreichung sind sie imstande, aus dem Nebennierenmark Katecholamine freizusetzen und somit den Blutdruck zu erhöhen. Eine Applikation von Bradykinin in die A. carotis interna provoziert die Ausschüttung von Adiuretin aus dem Hypophysenhinterlappen, sehr wahrscheinlich auch von Prostaglandinen (50).

Glukokortikoide vermögen die Freisetzung von Kininen zu drosseln (17).

5. Zur Pathologie

Neben ihrer Bedeutung bei entzündlichen und allergischen Reaktionen werden die Kinine auch für die Kreislaufsymptome des frühen Dumpingsyndroms verantwortlich gemacht. Blutdrucksenkung, Tachykar-

die, periphere Vasodilatation und Flush sind nämlich nicht mit der Serotoninwirkung zu erklären; und in der Tat gelang der Nachweis, daß in dieser Phase die Kininogenkonzentration im Plasma absinkt, während die des freien Plasmakinins ansteigt (50). Karzinoidtumoren mobilisieren außer Serotonin erhebliche Mengen von Kallikrein, welches wiederum für den charakteristischen Flush ursächlich ist (39).

MARGOLIUS und Mitarbeiter (1971) fanden eine erhöhte Kallikreinausscheidung bei Phäochromozytom und bei primärem Aldosteronismus (31).

Eine stark reduzierte Kallikreinausscheidung beschrieben WERLE und Mitarbeiter (1950, 1960) bei essentiellem Hochdruck und verschiedenen Nierenfunktionsstörungen, wie Schwangerschaftsnephropathie, Nephritis, Nephrose, Diabetes mellitus mit Tubulusschädigung, Salyrgan-nephropathie und bei myeloischer Leukämie (52, 53). Interessante Beobachtungen liegen aus diesem Arbeitskreis auch bezüglich Nierentransplantationen vor: Nach derartigen Eingriffen fällt die Kallikreinausscheidung zunächst deutlich ab. Wird das Transplantat toleriert, steigen die Werte allmählich wieder an; kommt es jedoch zu Abstoßungsreaktionen, imponiert ein Abfall der Kallikreinaktivität, noch bevor die üblichen klinischen Parameter eine Funktionsstörung anzeigen (55).

Nach VOGEL und Mitarbeiter (1962) ist nach Nebennierenexstirpation und Hypophysektomie ebenfalls eine reduzierte Harnkallikreinaktivität zu erwarten (47).

Chronische Lebererkrankungen führen zu einem starken Absinken des Präkallikreinspiegels im Plasma. Dies bestätigt die Leber als Hauptbildungsort des Plasmakallikreinogens (50).

Bei bestimmten pathologischen Prozessen konnte ein insuffizientes Kininogenasen-Inhibitoren-System ausfindig gemacht werden, so bei hereditärem Lungenemphysem und Osteoarthritis. KEELE und ARM-STRONG (1964) konnten freie Kinine in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatischer Arthritis nachweisen, womit die Schmerzsensationen begründet werden könnten (24).

III PROBLEMSTELLUNG

Zahlreiche Arbeitsgruppen beschäftigen sich heute schwerpunktmäßig mit der Kallikreinforschung und haben eine erhebliche Anzahl von wichtigen Erkenntnissen gewinnen können. Trotzdem kann der physiologische Stellenwert des Kallikrein-Kinin-Systems noch nicht mit letzter Exaktheit artikuliert werden.

Eine Fährte ergab sich nun aus Befunden verschiedener Autoren, welche eine Abhängigkeit der Kallikreinausscheidung von humoralen und vasoregulatorischen Faktoren konstatierten. So konnte die Feststellung von FREY, KRAUT und WERLE (1950), daß beim malignen Hochdruck die Kallikreinausscheidung stark erniedrigt ist, von weiteren Autoren bestätigt werden (6, 11). MARGOLIUS und Mitarbeiter (1971) fanden eine erhöhte Kallikreinausscheidung bei Phäochromozytom und primärem Hyperaldosteronismus (31). WERLE und Mitarbeiter (1973) gelang der Nachweis einer positiven Korrelation von Metanephrin-

und Kallikreinausscheidung auch beim gesunden Menschen (21, 55). GELLER und Mitarbeiter (1972) beschrieben einen erhöhten Exkretionswert nach Mineralokortikoidapplikation sowie einen reduzierten Exkretionswert bei adrenaletomierten Individuen (18).

Es liegen ebenso Informationen vor, die eine Beziehung des Kallikreins zur Natriuresis nahelegen. Diätversuche zeigten, daß Natriummangel mit erhöhter Kallikreinexkretion korreliert ist und umgekehrt (18, 37, 48).

In dieser Arbeit soll der Versuch unternommen werden, weitere den Kreislauf und Elektrolyt-Wasser-Haushalt beeinflussende Substanzen hinsichtlich ihrer Einflußnahme auf die Kallikreinausscheidung zu prüfen. Hierfür wurden ausgewählt: Spironolacton, Propranolol, Östrogen. Ergänzend dazu wurde ein Diätversuch mit kochsalzarmer und kochsalzreicher Kost durchgeführt.

B EXPERIMENTELLER TEIL

I DEFINITION DER EINHEITEN

1. Enzymatische Kallikreineinheit

Eine enzymatische Kallikreineinheit (eKE) ist diejenige Menge Kallikrein, die unter Standardbedingungen 1 μ Mol N ^{α} -Benzoyl-L-arginin-äthylester (BAEE) pro Minute umsetzt.

1 eKE entspricht somit 1 IU (internationale Unit). Der 1000. Teil dieser Kallikreinmenge ist 1 meKE bzw. 1 mU (44, 46).

2. Biologische Kallikreineinheit

Eine biologische Kallikreineinheit (KE) ist diejenige Menge Kallikrein, die bei i. v. Injektion am narkotisierten Hund dieselbe Karotisdrossen-senkung auslöst, wie 5 ml Harn von gesunden Menschen aus einer Sammelprobe von mindestens 50 l, die 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert worden war. In der anglo-amerikanischen Literatur findet sich hierfür auch die Bezeichnung FU = Frey Unit (16).

Biologische und enzymatische Kallikreineinheiten sind nicht identisch. Für Kallikreine verschiedener Spezies ergeben sich differente Umrechnungsfaktoren (x), wie nachstehende Tabelle zeigt:

 Kallikrein aus:

Menschenharn	x = 8,8
Schweineharn	x = 2,3
Schweineserum	x = 0,8
Schweinepankreas	x = 1,0
Schweinesubmandibularis	x = 2,3

Umrechnung: $\text{mU} = x \cdot \text{KE}$

3. Inhibitor-Einheiten

Eine Einheit des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors (Trasylol^R) aus Rinderorganen (KIE) ist diejenige Menge Inhibitor, die unter Standardbedingungen (bei 37°C und pH 8,0 15 Minuten Inkubation) 2 KE aus Schweinepankreas zu 50 % hemmt.

Eine enzymatische Inhibitor-Einheit wird definiert als diejenige Inhibitormenge, die unter Standardbedingungen (bei Raumtemperatur und pH-Optimum des Enzyms 15 Minuten Inkubation) die Aktivität von 2 eKE zu 50 % hemmt, bzw. den Substratumsatz bei Standardbedingungen um 1 $\mu\text{Mol/min}$ reduziert. Der 1000. Teil dieser Inhibitormenge ist 1 mIE (16).

II BESTIMMUNGSMETHODEN

1. Spektrophotometrische Bestimmung des Harnkallikreins

Bei dieser Methode nach TRAUSCHOLD und WERLE (1961) mißt man die Spaltungsgeschwindigkeit von N^{α} -Benzoyl-L-argininäthylester (BAEE) nach folgenden Reaktionsgleichungen (45):



a) Reagenzien

1. Nikotinamid-adenin-dinucleotid (NAD^+)

(Boehringer Mannheim)

Auf je 1 ml Aqua bidest. 20 mg NAD^+

2 Tage haltbar

2. N^{α} -Benzoyl-L-argininäthylester (BAEE)

(Merck)

Auf je 1 ml Aqua bidest 1 mg BAEE

1 Tag haltbar

3. Alkoholdehydrogenase (ADH , Kristallsuspension)

(Boehringer Mannheim)

1 Ampulle zu 3,4 ml enthält 100 mg ADH

4. Trasylol^R, Kallikreininhibitor aus Rinderorganen
(Bayer)

1 Ampulle enthält 100 000 KIE/10 ml

5. Pyrophosphatpuffer pH 8,7

hergestellt aus: 15,2 g Natriumpyrophosphat

4,1 g Semicarbacid

0,9 g Glycin

in 500 ml Aqua bidest. gelöst und mit 2 n NaOH auf pH 8,7
eingestellt.

14 Tage haltbar

b) Durchführung

2 ml Rattenharn aus einer 24-Stunden-Sammelprobe werden in einem Zellophan-Dialysierbeutel (Hersteller Kalle AG) 12 Stunden in mindestens 1 l Aqua dest. unter ständigem Rühren dialysiert. Danach wird das Volumen nach der Dialyse bestimmt und zentrifugiert.

1 ml des überstehenden Klardialysates wird nun mit 0,01 ml Trasylol^R versetzt und intensiv vermischt.

In je zwei Küvetten, Schichtdicke 1 cm, werden pipettiert:

0,02 ml ADH

2,4 ml Pyrophosphatpuffer

0,5 ml BAEE-Lösung

0,1 ml NAD⁺-Lösung

Die beiden Ansätze werden gut vermischt und 5 Minuten bei 25°C inkubiert.

In die erste Küvette wird sodann 0,02 ml Dialysat + Trasylol, in die zweite Küvette nur 0,02 ml Dialysat pipettiert und wiederum gut vermischt. Das Endvolumen in jeder Küvette beträgt 3,04 ml.

Nach abermaliger Inkubationszeit von 2 Minuten mißt man die Extinktionsänderung beider Küvetten während 10 Minuten bei einer Wellenlänge von Hg 366 nm und einer Temperatur von 25°C. Zwei Werte werden nun registriert:

1. $\Delta E O / 10 \text{ min}$ = Leerwert (Kallikreinaktivität wurde durch Trasylol^R gehemmt),
2. $\Delta E M / 10 \text{ min}$ = Meßwert (ungehemmte Kallikreinaktivität).

c) Berechnung

Die Differenz aus dem Meßwert ($\Delta E M$) und dem Leerwert ($\Delta E O$) ist größtmäßig von der Harnkallikreinkonzentration abhängig. Der Wert für $\Delta E O$ muß noch korrigiert werden, da pro ml Dialysat 0,01 ml Trasylol^R zugesetzt wurden. Da dies einer 1 %igen Verdünnung entspricht, muß der Leerwert mit 0,01 multipliziert werden. Für die weitere Berechnung wird der molare Extinktionskoeffizient ϵ herangezogen, der, bei der entsprechenden Wellenlänge pro cm Schichtlänge, der Extinktion entspricht, die eine 1 molare Lösung des Produktes (hier NADH) besitzt. Als Berechnungsgrundlage gilt nachstehende Formel (7):

$$\text{Aktivität} \propto \Delta E / \text{min} \cdot \frac{10^6}{\epsilon \cdot d \cdot AV} \cdot \frac{EV}{AV} \left[\frac{\text{mU}}{\text{ml}} \right]$$

Dabei bedeutet:	$\Delta E/\text{min};$	$\frac{\Delta EM - (\Delta EO \cdot 1,01)}{10}$
	EV das Endvolumen:	3,04 (ml)
	AV das Analysenvolumen:	0,02 (ml)
	d die Schichtlänge der Küvetten:	1,0 (cm)
	ϵ für NADH bei Hg 366 nm:	$3,30 \cdot 10^3$ ($1 \text{ Mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

Setzt man diese Größen in obige Formel ein, so ergibt sich für die Aktivität (A) im Dialysat bei Hg 366 nm:

$$A = \frac{\Delta EM - (\Delta EO \cdot 1,01)}{10} \cdot \frac{10^6 \cdot 3,04}{3,30 \cdot 10^3 \cdot 1,0 \cdot 0,02}$$

Unter zusätzlicher Berücksichtigung der osmotisch bedingten Volumenänderung im Dialysierbeutel während der Dialyse erhält man:

$$A = \frac{\Delta EM - (\Delta EO \cdot 1,01)}{10} \cdot 46\,060,6 \cdot \frac{V_{n.D.}}{V_{v.D.}} \left[\frac{\text{mU}}{\text{ml}} \right]$$

V._{n.D.}: Volumen nach Dialyse

V._{v.D.}: Volumen vor Dialyse

2. Biologische Bestimmung des Harnkallikreins

Als Maß dient bei dieser Methode die Blutdruckänderung im großen Kreislauf nach i.v. Injektion der Probelösungen. Hierfür eignet sich am besten ein künstlich beatmeter, atropinisierte, mit Pernocton oder Barbital narkotisierte Hund, dessen Karotisdruck fortlaufend re-

gistriert wird. Man vergleicht die Wirkung der applizierten Probe mit einer Standardlösung aus Menschen- oder Schweineharn, die so eingestellt wird, daß der Kallikreingehalt 1 KE/ml entspricht, gemäß der Definition der Kallikreineinheit.

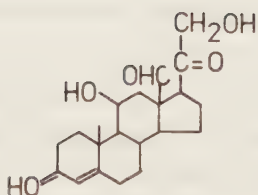
Man wählt den Hund als Versuchstier, weil er gut auf Kallikrein anspricht und weniger gut auf Histamin und Renin, wie beispielsweise Katzen und Meerschweinchen. Das Verfahren eignet sich vorzüglich zur Harn- und Plasmakallikreinbestimmung, da die Versuchstiere über mehrere Stunden gleichmäßig reagieren, sofern kleine Kallikreinmengen (0,01 - 0,03 KE/kg) bei genügenden Pausen zwischen den Injektionen (3 - 5 Minuten) verabreicht werden. Die untere Grenze der Ansprechbarkeit liegt bei 0,005 - 0,002 KE je kg Tier (16).

III TIERVERSUCHE

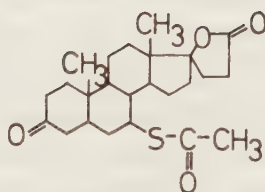
Für die folgenden Untersuchungen wurden ausschließlich weibliche Albinoratten von etwa 200 g Körpergewicht verwendet.

1. Versuch mit Spironolacton

Spironolacton gilt als wirksamster Antagonist des Aldosterons, des wichtigsten Mineralokortikoids der Nebenniere.



ALDOSTERON



SPIRONOLACTON

Die physiologische Wirkung des Aldosterons besteht hauptsächlich in der Natriumrückresorption aus Harn, Speichel, Schweiß und Magensaft. Am effektivsten geschieht dies im distalen Tubulusabschnitt, wobei ein Austausch von Na^+ -Ionen gegen K^+ - und H^+ -Ionen stattfindet. Außerdem kommt dem Aldosteron eine glukokortikoidartige Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel zu.

Die Folgen eines Hyperaldosteronismus sind demnach Hybernatriämie mit konsekutiver Hypervolämie, Hypokaliämie und Alkalose. Daraus ergibt sich eine umfangreiche klinische Symptomatik mit dem Kardinalsymptom Hypertonie.

Die Regulation der Aldosteronsekretion wird in erster Linie bestimmt vom Renin-Angiotensin-System. Insofern findet sich beim primären Hyperaldosteronismus eine reduzierte Reninsekretion, beim sekundären Hyperaldosteronismus jedoch eine erhöhte Reninproduktion.

Die Aldosteronwirkung kann auf zweierlei Weise ausgeschaltet werden:

- durch Hemmung der Aldosteronbildung in der Nebennierenrinde mittels Metopiron und Amphenon, sowie

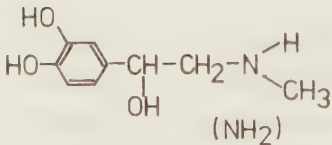
- durch kompetitive Hemmung im distalen Tubulusabschnitt mittels Spironolacton.

Spironolacton bedingt eine vermehrte Ausscheidung von Na^+ - und Cl^- -Ionen durch reduzierten Kationenaustausch im distalen Teil des Nephrons. Daraus resultiert im wesentlichen seine diuretische und blutdrucksenkende Wirkung. Weitere spezifische bzw. humorale Potenzen dieser Substanz sind umstritten (17, 42).

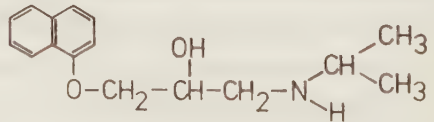
Dieser Versuch soll nun zeigen, ob die parenterale Applikation des Aldosteronantagonisten die Kallikreinausscheidung bei der Ratte beeinflusst. Als Präparat wurde Aldactone^R pro injectione in der Dosierung von 0,8 mg pro die intraperitoneal verwendet.

2. Versuch mit Propranolol

Propranolol gilt als typisches β -Rezeptoren-blockierendes Sympathikolytikum.



ADRENALIN
(NORADRENALIN)



PROPRANOLOL

Nach der Theorie AHLQUISTs (1948) entfalten die Katecholamine ihre Wirkung über Rezeptorensysteme in den Erfolgsorganen. Die α -Rezep-

torenaktivität ist identisch mit peripherer Vasokonstriktion, die β -Rezeptorenaktivität mit kardialer Stimulation. Im β -System unterscheidet man des weiteren die β_1 -Rezeptoren - identisch mit positiver Ino- und Chronotropie, Erschlaffung der Darmmuskulatur, Lipolyse, Kalorigenese - von den β_2 -Rezeptoren - identisch mit Bronchodilatation, Vasodilatation, Glykogenolyse. Das biologische Äquivalent der β -Rezeptoren ist das Adenylzyklasesystem.

Für die physiologische Wirkung der Katecholamine ergab sich, daß die periphere Kreislaufwirkung des Noradrenalins mit dessen α -Rezeptorenaktivität, die Herz- und Stoffwechselwirkung des Adrenalins mit dessen β -Rezeptorenaktivität korreliert.

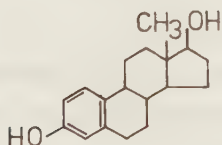
Beide Systeme lassen sich isoliert stimulieren und hemmen. Die bedeutendste β -stimulierende Substanz ist das Isoproterenol, die bedeutendste β -blockierende Substanz das Propranolol.

Die β -Rezeptorenblocker hemmen spezifisch kompetitiv die erregende Wirkung der Katecholamine am Herzen und zeigen eo loco einen chinidinartigen Effekt. Neben der kardiodepressiven und antiarrhythmischen Wirkung kommt diesen Substanzen noch eine lokalanästhetische und zentral sedierende (Propranolol) Wirkung zu. Auf die Hämodynamik wirken die β -Blocker gegensinnig: einerseits Reduktion des Herzminutenvolumens, andererseits Erhöhung des peripheren Widerstandes (1, 4,12).

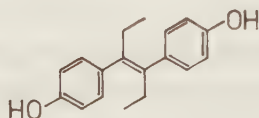
In diesem Versuch soll nun geprüft werden, ob die parenterale Applikation des β -Blockers Propranolol einen Einfluß auf die Kallikreinausscheidung bei der Ratte ausübt. Als Präparat wurde Dociton^R-Ampulle in der Dosierung von 0,4 ml i.m. bzw. 0,8 ml i.p. pro die verwendet, entsprechend 0,4 mg bzw. 0,8 mg Propranolol.

3. Versuch mit Östrogen

Von den weiblichen Sexualhormonen kommt den Östrogenen die für das weibliche Geschlecht typische somatische und psychische Determination zu. Östradiol als Repräsentant der biogenen Östrogene gehört chemisch zu den Steroidhormonen. Die östrogen-wirksamen synthetischen Stilbenderivate imitieren diesen Aufbau.



ÖSTRADIOL - 17β



DIÄTHYLSTILBÖSTROL

Die Einordnung der Sexualhormone in den thalamo-hypophysären Regelkreis sei hier nur erwähnt. Hauptaufgabe der Östrogene ist die trophische Wirkung auf Ovar, Uterus, Vagina und Mammae, die Realisation des weiblichen Phänotypus schlechthin sowie die permissive Wirkung auf die Gestagene im Zyklusgeschehen.

Von den extragenitalen Wirkungen der Östrogene interessiert besonders die Salz- und Wasserretention als Hypertoniefaktor. Außerdem ist die ACTH-Sekretion nach Stressituationen unter Östrogeneinfluß deutlich erhöht.

Als weitere extragenitale Östrogeneffekte sind bekannt: anabole, osteoblastenaktivierende, temperatursenkende Wirkung sowie die antiatherogene Wirkung (17, 42).

In diesem Versuch soll gezeigt werden, welchen Einfluß die parenterale Applikation eines synthetischen Östrogens auf die Kallikreinausscheidung bei der Ratte hat. Als Präparat wurde Cyren^R-B forte in der Dosierung von 0,05 ml i.m. pro die verwendet, entsprechend 0,125 mg Diäthylstilböstrol.

4. Natriumfütterungsversuche

Natrium verhält sich im Gegensatz zum Kalium im Organismus pharmakologisch weitgehend inert. Neben seiner Rolle bezüglich der neuromuskulären Erregbarkeit ist es im wesentlichen Hauptträger des osmotischen Gleichgewichtes in der extrazellulären Flüssigkeit. Änderungen der extrazellulären Natriumkonzentration haben zwangsläufig Störungen des Wasserhaushaltes zur Folge.

Als osmotisch aktivem Elektrolyt kommt ihm jedoch auch eine erhebliche Bedeutung bei der Kreislaufregulation zu, allerdings in Abhängigkeit von zentralen und peripheren Faktoren, deren wichtigsten das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System darstellt. Natriumretention führt im pathophysiologischen Ablauf zur Hypertension, die durch forcierte Natriuresis wieder durchbrochen werden kann (17, 42).

a) Versuch mit natriumarmer Diät

In diesem Versuch soll geprüft werden, inwiefern die orale Verabreichung einer natriumarmen Diät die Kallikreinausscheidung bei der Ratte beeinflusst. Als Futter wurde eine natrium- und chlorarme Altromin^R-Sonderdiät für Ratten und Mäuse (Altromin GmbH,

Lage/Lippe) verwendet mit einem Natriumgehalt von ca. 50 mg und einem Chlorgehalt von ca. 75 mg in 1000 g Diät, entsprechend einem Mineralstoffgehalt von 0,005 % Natrium und 0,0075 % Chlor in der Diät. Als Flüssigkeit wurde den Tieren destilliertes Wasser gegeben.

Zubereitung der Sonderdiät: Der pulverisierten Futtermasse wurde unter beständigem Umrühren 50 % destilliertes Wasser zugesetzt. Der feste Teig wurde in Würfel geschnitten und anschließend bei 50°C im Trockenschrank getrocknet.

b) Versuch mit "natriumreicher" Diät

Dieser Versuch dient zur Feststellung, ob die orale Zufuhr einer "natriumreichen" Diät einen Einfluß auf die Kallikreinausscheidung bei der Ratte hat. Als Trinkflüssigkeit wurde physiologische Kochsalzlösung (Braun Melsungen/Pfrimmer Erlangen) verwendet, welche 9,0 g Natriumchlorid pro 1000 ml sowie 154 mVal Na^+ und 154 mVal Cl^- pro Liter enthält. Die Tiere bekamen ansonsten Al-tromin^R-Normalkost.

5. Erläuterung zur statistischen Überprüfung der Ergebnisse

Um die tatsächliche Veränderung der Harnkallikreinausscheidung unter der Wirkung der genannten Substanzen von rein zufälligen Schwankungen zu unterscheiden, werden die Meßergebnisse bei den behandel-

ten Tieren mit denen von Kontrolltieren statistisch verglichen. Hierzu dient der Student-T-Test. Mit Hilfe der Testgröße T kann nach tabellarischer Auswertung die prozentuale Irrtumswahrscheinlichkeit bezüglich der Abhängigkeit der täglichen Harnkallikreinausscheidung von der pharmakologischen Wirkung bestimmt werden (8, 41).

Die Testgröße T errechnet sich nach folgender Formel:

$$T = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

- $\bar{x}_1$ $\hat{=}$ Mittelwert der täglichen Kallikreinausscheidung der Kontrolltiere
- $\bar{x}_2$ $\hat{=}$ Mittelwert der täglichen Kallikreinausscheidung der behandelten Tiere
- s_1 $\hat{=}$ Standardabweichung von $\bar{x}_1$
- s_2 $\hat{=}$ Standardabweichung von $\bar{x}_2$
- n_1 $\hat{=}$ Anzahl der Meßwerte bei den Kontrolltieren
- n_2 $\hat{=}$ Anzahl der Meßwerte bei den behandelten Tieren
- n $\hat{=}$ $n_1 + n_2$

Die Irrtumswahrscheinlichkeit wird dabei durch die Größe p prozentual ausgedrückt.

Für eine ausreichende statistische Signifikanz wird $p < 0,05$, besser jedoch $p < 0,01$ gefordert. Dies würde also einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % bzw. 1 % entsprechen.

C ERGEBNISSE

In den einzelnen Versuchsreihen wurden die Werte für die tägliche Harnkallikreinausscheidung von jeweils 5 mit dem zu prüfenden Pharmakon behandelten Albinoratten gegenüber jeweils 5 unbehandelten Kontrolltieren bestimmt.

Erläuterung der Graphiken:

Die Ordinate repräsentiert die Kallikreinausscheidung in mU/24 h, auf der Abszisse ist die Versuchsdauer in Tagen aufgetragen. Die durchgezogene Kurve entspricht den bei den Kontrolltieren gefundenen Mittelwerten für die Kallikreinausscheidung, die Punkte bedeuten Streuwerte. Die unterbrochen gezeichnete Kurve entspricht den bei den behandelten Tieren gefundenen Mittelwerten, die Dreiecke bedeuten Streuwerte.

I VERSUCH MIT SPIRONOLACTON

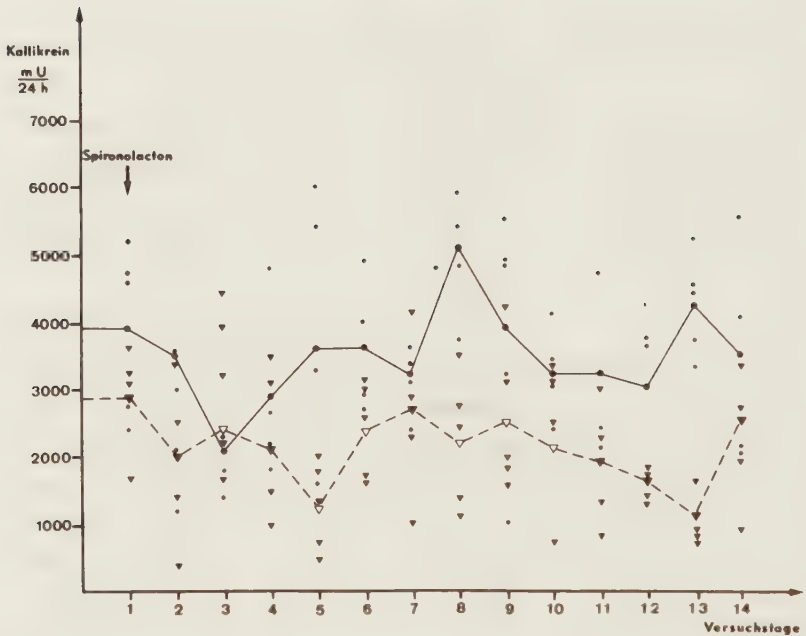
1. Meßergebnis

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der Kallikreinausscheidung in mU/24 h an den einzelnen Versuchstagen für die mit Spironolacton behandelten und die Kontrolltiere (siehe Tabelle Seite 33).

Versuchstag	Behandelte Tiere	Kontrolltiere
1.	2853,97 (Leerwert)	3905,17
2.	2028,92	3468,31
3.	2398,97	2136,00
4.	2125,18	2893,61
5.	1218,76	3626,91
6.	2395,22	3576,79
7.	2675,41	3174,48
8.	2202,48	5054,96
9.	2540,97	3927,12
10.	2055,83	3203,89
11.	1860,12	3234,41
12.	1605,84	3022,46
13.	1128,38	4226,47
14.	2468,83	3406,24

Betrachtet man die graphische Darstellung der ermittelten Werte, so fällt auf, daß die Mittelwertkurve der mit Spironolacton behandelten Tiere deutlich absinkt (siehe Abbildung Seite 34).

Dies führt zu dem Schluß, daß Spironolacton die Kallikreinausscheidung bei der Ratte im Sinne einer Depression beeinflusst.



2. Statistische Überprüfung

Kontrolltiere:

Mittelwert der Kallikreinausscheidung	3475,9733 mU/ml
Standardabweichung	$\pm 1249,4850$ mU/ml
Anzahl der Meßwerte (n_1)	80

Behandelte Tiere:

Mittelwert der Kallikreinausscheidung	2093,2876 mU/ml
Standardabweichung	$\pm 972,3328$ mU/ml
Anzahl der Meßwerte (n_2)	65

Für T ergibt sich: $T = 7,3138$

Freiheitsgrad (n - 2): 143

Geforderter Wert für T: 3,3600 ($p = 0,0005$)

Die durch Spironolacton verursachte Senkung der Kallikreinausscheidung ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,0005$ als hochsignifikant zu bezeichnen.

II VERSUCH MIT PROPRANOLOL

1. Meßergebnis

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der Kallikreinausscheidung in mU/24 h an den einzelnen Versuchstagen für die mit Propranolol behandelten und die Kontrolltiere; (siehe Tabelle Seite 37).

Bei Betrachtung der graphischen Darstellung der ermittelten Werte fällt wiederum auf, daß die Mittelwertkurve der mit Propranolol behandelten Tiere nach abwärts tendiert (siehe Abbildung Seite 38).

Diese Befunde erlauben die Aussage, daß auch Propranolol die Kallikreinausscheidung bei der Ratte senkt.

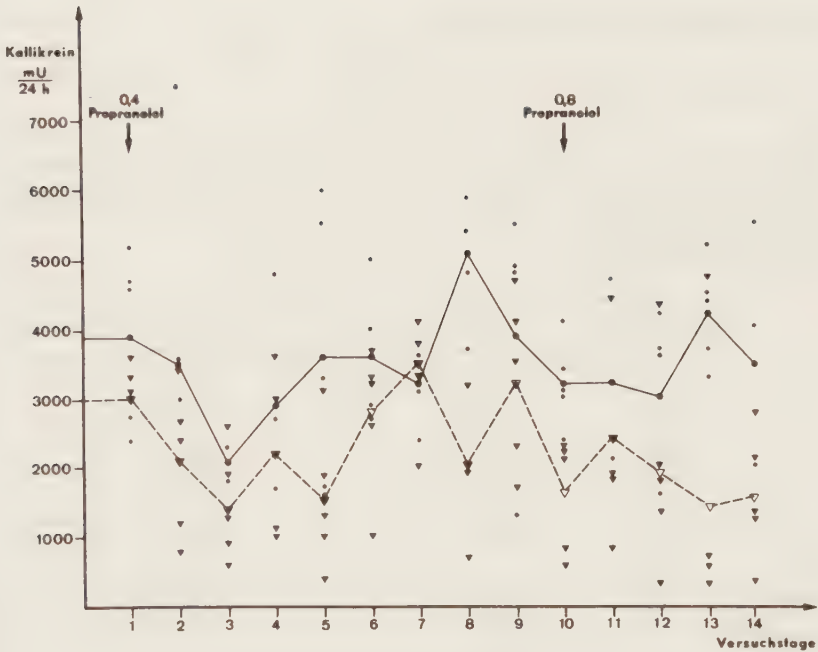
Versuchstag	Behandelte Tiere	Kontrolltiere
1.	3007,16 (Leerwert)	3905,17
2.	2077,75	3468,31
3.	1449,94	2136,00
4.	2240,33	2893,61
5.	1540,37	3626,91
6.	2764,93	3576,79
7.	3452,99	3174,48
8.	2009,16	5054,96
9.	3222,25	3927,12
10.	1601,10	3203,89
11.	2414,24	3234,41
12.	1923,43	3022,46
13.	1376,19	4226,47
14.	1515,11	3406,24

Eine Verdoppelung der Propranololdosis am 10. Versuchstag führte zu keinem forcierten Absinken der Kallikreinausscheidung.

2. Statistische Überprüfung

Kontrolltiere:

Mittelwert der Kallikreinausscheidung	3475,9733 mU/ml
Standardabweichung	$\pm$ 1249,4850 mU/ml
Anzahl der Meßwerte (n_1)	80



Behandelte Tiere:

Mittelwert der Kallikreinausscheidung	2126,3395 mU/ml
Standardabweichung	$\pm 1254,1928$ mU/ml
Anzahl der Meßwerte (n_2)	65

Für T ergibt sich: $T = 6,4674$ Freiheitsgrade ($n - 2$): 143Geforderter Wert für T: 3,3600 ($p = 0,0005$)

Auch die durch Propranolol induzierte Senkung der Kallikreinausscheidung ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,0005$ als hochsignifikant zu bezeichnen.

III VERSUCH MIT ÖSTROGEN

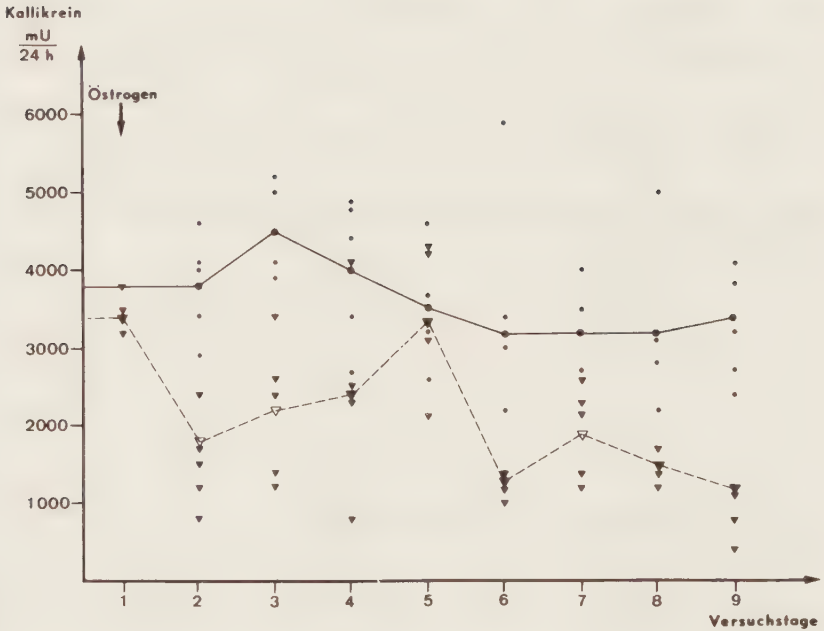
1. Meßergebnis

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der Kallikreinausscheidung in mU/24 h an den jeweiligen Versuchstagen für die mit Östrogen behandelten und die Kontrolltiere:

Versuchstag	Behandelte Tiere	Kontrolltiere
1.	3444,93 (Leerwert)	3784,47
2.	1750,64	4453,22
3.	2195,22	4453,22
4.	2415,86	4019,20
5.	3443,07	3494,35
6.	1314,03	3226,27
7.	1910,41	3209,84
8.	1489,88	3240,85
9.	1197,45	3442,62

Bei Betrachtung der graphischen Darstellung der ermittelten Werte imponiert die abfallende Mittelwertkurve der mit Östrogen behandelten Tiere (siehe Abbildung Seite 40).

Nach diesem Befund senkt Östrogen die Kallikreinausscheidung bei der Ratte.



2. Statistische Überprüfung

Kontrolltiere:

Mittelwert der Kallikreinausscheidung	3576,905 mU/ml
Standardabweichung	$\pm$ 906,857 mU/ml
Anzahl der Meßwerte (n_1)	45

Behandelte Tiere:

Mittelwert der Kallikreinausscheidung	1946,8617 mU/ml
Standardabweichung	$\pm$ 992,3389 mU/ml
Anzahl der Meßwerte (n_2)	40

Für T ergibt sich: $T = 7,9145$

Freiheitsgrade ($n - 2$): 83

Geforderter Wert für T: 3,4121 ($p = 0,005$)

Somit senkt Östrogen die Kallikreinausscheidung bei der Ratte auch statistisch hochsignifikant, da $p < 0,005$.

IVa VERSUCH MIT NATRIUMARMER DIÄT

1. Meßergebnis

Die Tabelle umfaßt die Mittelwerte der Kallikreinausscheidung in mU/24 h an den einzelnen Versuchstagen für die natriumarm ernährten und die Kontrolltiere (Tabelle siehe Seite 42).

Die graphische Darstellung der ermittelten Werte läßt ein deutliches Ansteigen der Mittelwertkurve der natriumarm ernährten Tiere erkennen (Abbildung siehe Seite 43).

Nach diesem Befund läßt natriumarme Diät die Kallikreinausscheidung bei der Ratte ansteigen.

Versuchstag	Behandelte Tiere	Kontrolltiere
1.	3010,34 (Leerwert)	3221,65
2.	1030,04	1873,29
3.	2198,33	3901,53
4.	2959,40	1815,15
5.	2198,91	1483,50
6.	2248,12	1084,92
7.	2166,55	1487,44
8.	1414,65	892,85
9.	3637,78	1985,16
10.	2130,63	2208,64
11.	3126,99	930,64
12.	3479,60	2222,75
13.	3323,90	1312,87
14.	3219,82	1076,84
15.	4715,77	1003,19

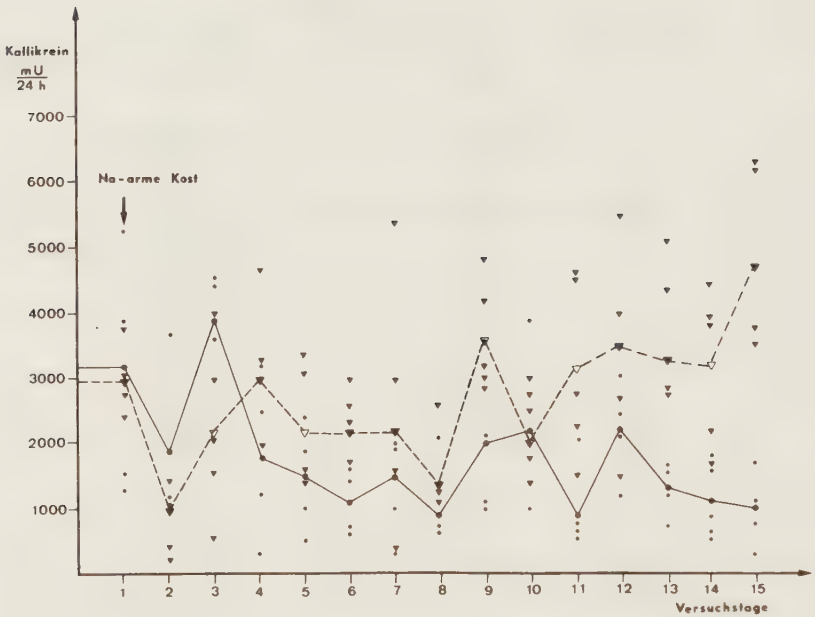
2. Statistische Überprüfung

Kontrolltiere:

Mittelwert der Kallikreinausscheidung	1889,2868 mU/ml
Standardabweichung	$\pm$ 1210,9616 mU/ml
Anzahl der Meßwerte (n_1)	90

Behandelte Tiere:

Mittelwert der Kallikreinausscheidung	2701,1097 mU/ml
Standardabweichung	$\pm$ 1427,6622 mU/ml
Anzahl der Meßwerte (n_2)	75



Für T ergibt sich:

$T = -3,9558$

Freiheitsgrade ($n - 2$):

163

Geforderter Wert für T:

3,3517 ($p = 0,0005$)

Damit ist mit höchster statistischer Signifikanz der fördernde Einfluß einer natriumarmen Diät auf die Kallikreinausscheidung bei der Ratte erwiesen.

IVb VERSUCH MIT "NATRIUMREICHER" DIÄT

1. Meßergebnis

Die Tabelle erfaßt die Mittelwerte der Kallikreinausscheidung in mU/24 h an den jeweiligen Versuchstagen für die "natriumreich" ernährten und die Kontrolltiere:

Versuchstag	Behandelte Tiere	Kontrolltiere
1.	3119,94 (Leerwert)	3221,65
2.	1994,17	1873,29
3.	3083,08	3901,53
4.	2404,90	1815,15
5.	1119,87	1483,50
6.	962,17	1084,92
7.	2174,82	1487,44
8.	907,97	892,85
9.	3332,75	1985,16
10.	924,50	2208,64
11.	1461,69	930,64
12.	2884,75	2222,75
13.	1348,68	1312,87
14.	1044,31	1076,84
15.	1270,82	1003,19

Die graphische Darstellung der ermittelten Werte würde zwei weitgehend parallele Kurven ergeben. Auf deren Wiedergabe kann deshalb verzichtet werden.

Die dargebotene "natriumreiche" Diät hatte somit keinen Einfluß auf die Kallikreinausscheidung bei der Ratte.

2. Statistische Überprüfung

Kontrolltiere:

Mittelwert der Kallikreinausscheidung	1889,2868 mU/ml
Standardabweichung	$\pm$ 1210,9616 mU/ml
Anzahl der Meßwerte (n_1)	90

Behandelte Tiere:

Mittelwert der Kallikreinausscheidung	1770,7954 mU/ml
Standardabweichung	$\pm$ 1215,1352 mU/ml
Anzahl der Meßwerte (n_2)	75

Für T ergibt sich: $T = 0,6254$

Freiheitsgrade ($n - 2$): 163

Geforderter Wert für T: 1,6543 ($p = 0,05$)

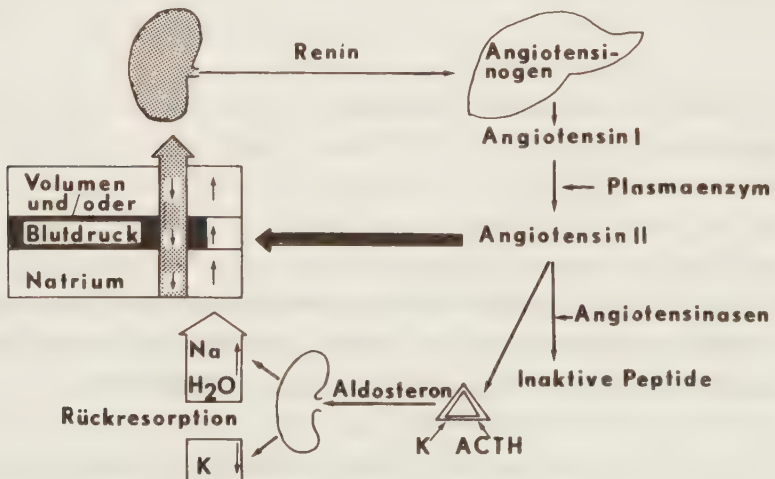
Der geforderte Wert für T wird in diesem Versuch selbst für den statistisch relevanten Grenzwert von $p = 0,05$ nicht annähernd erreicht. Damit steht fest, daß die in diesem Versuch verabreichte "natriumreiche" Kost die Kallikreinausscheidung bei der Ratte nicht beeinflußt hat.

D DISKUSSION

Stromzeitvolumen und peripherer Widerstand bestimmen primär den Blutdruck. Diese Kardinalgrößen werden wiederum von einem multifaktoriellen System der Regulation und Gegenregulation beeinflusst:

- vom bulbären Kreislaufzentrum,
- vom Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-System,
- vom Renin-Angiotensin-Aldosteron-System,
- von Elektrolyten und Kataboliten.

Wegen seiner enormen Bedeutung als autonomes Aktionsfeld im subzentralen Regulationsbereich sei das Schema des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Mechanismus vorangestellt:



Die in diesem System wirksamen Substanzen dienen vornehmlich der Erhaltung des Kreislaufs, sie wirken also tonisierend auf die Gefäße. Beim Kallikrein handelt es sich um eine gefäßerweiternde Substanz, für deren Beteiligung an der Kreislaufregulation zahlreiche Beobachtungen sprechen, vor allem auch für die Konnexion des Kallikrein-Kinin-Systems mit dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (32, 38). Renin und Kallikrein werden höchstwahrscheinlich in der Niere gebildet. Sie setzen beide niedermolekulare Peptide frei, die auf den Blutdruck eine gegensätzliche Wirkung ausüben. Sowohl Angiotensin II als auch die Kinine werden rasch inaktiviert, wodurch einer Blutdruckentgleisung in der einen oder anderen Richtung vorgebeugt wird.

Der Anstieg der Kallikreinausscheidung durch Aldosteron, wie von MARGOLIUS und Mitarbeiter (1971) zuerst beschrieben (31) und vom Arbeitskreis um WERLE (1973) bestätigt (21, 49), weist dem Aldosteron eine gewisse Schlüsselposition bezüglich des Kontaktes zwischen den beiden Systemen zu. Die Reduktion der Kallikreinausscheidung nach Applikation des Aldosteronantagonisten Spironolacton, wie sie in der vorliegenden Arbeit mit $p < 0,0005$ statistisch höchstsignifikant nachgewiesen werden konnte, untermauert diese Hypothese.

Verschiedene Autoren postulieren eine Hemmung der Reninfreisetzung durch Aldosteron (17, 19). Andererseits liegen Untersuchungen aus dem Arbeitskreis um WERLE (1973) vor, nach denen Angiotensin II

eine Verminderung der Harnkallikreinausscheidung bewirkt (21). GANONG (1972) hat nun ein Denkmodell erarbeitet, welches in Verbindung mit den Ergebnissen von WERLE und Mitarbeiter (1973) die Erhöhung der Kallikreinausscheidung auf Aldosteron erklären könnte (17, 21): Die Hemmung der Reninfreisetzung durch Aldosteron führt zu einer verminderten Angiotensin-II-Bildung, welche nach den an unserem Institut durchgeführten Untersuchungen letzten Endes für die vermehrte Kallikreinausscheidung verantwortlich zeichnet. Angiotensin II reguliert wiederum die Aldosteronsekretion, das bedeutet, bei Angiotensin-II-Reduktion sinkt auch der Aldosteronspiegel. Die stark erhöhte Kallikreinausscheidung bei Hyperaldosteronismus könnte demnach auf einem Angiotensin-II-Mangel beruhen (17).

Der umgekehrte Effekt bei Applikation des Aldosteronantagonisten scheint auch diese These zu stützen, zumal Spironolacton als Renin-stimulator bekannt ist (42).

Die von MARGOLIUS und Mitarbeiter (1971) festgestellte Erhöhung der Kallikreinausscheidung beim Phäochromozytom wurde vom Arbeitskreis um WERLE dahingehend präzisiert, daß auch beim Gesunden ein linearer Zusammenhang zwischen Kallikreinausscheidung und Metanephrinausscheidung besteht (21, 55).

Katecholamine stimulieren offenbar adrenerge β -Rezeptoren der re-

ninspeichernden Zellen und fördern somit die Synthese und/oder Sekretion von Renin. Angiotensin II vermag nur in unphysiologisch hohen Dosen eine Katecholaminausschüttung zu bewirken (30).

Der β -Rezeptorenblocker Propranolol gilt als Renininhibitor (42). Sollte die Kallikreinbildung bzw. -ausscheidung auch hier durch Angiotensin II initiiert werden, so müßte ähnlich wie beim Aldosteron eine erhöhte Kallikreinausscheidung resultieren. Dies ist jedoch nicht der Fall. Wir konnten dagegen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,0005$ bei unserem Versuch eine höchstsignifikante Verminderung der Kallikreinausscheidung notieren. Eine am 10. Versuchstag vorgenommene Verdoppelung der Propranololdosis zeigte im weiteren Verlauf keinen meßbaren Effekt.

Über welches Agens die Katecholamine bzw. das Propranolol die Kallikreinausscheidung in der Niere beeinflußt, ist noch unklar und muß weiteren grundsätzlichen Versuchsreihen vorbehalten werden.

Nach neuesten Berichten aus der Literatur ist die Plasmareninaktivität (PRA) deutlich zyklusabhängig. KAULHAUSEN (1974) beobachtete bei Frauen mit normalem Zyklus einen PRA-Anstieg in der zweiten Hälfte der Follikelphase, einen vorübergehenden PRA-Abfall um den Zeitpunkt der Ovulation und daran anschließend einen erneuten PRA-Anstieg. Frauen in der Postmenopause wiesen hingegen einen konstant niedrigen PRA-Spiegel auf (23).

Als mögliche Ursachen für die PRA-Erhöhung durch Östrogene erachtet KAULHAUSEN:

- eine gesteigerte Synthese des Reninsubstrates in der Leber,
- den natriuretischen und damit reninstimulierenden Effekt der Östrogene,
- eine vermehrte Proteinbindung des Angiotensins mit konsekutiver Reninstimulation,
- eine Förderung der Angiotensinasen.

Als gesichert betrachtet der Autor die vermehrte Angiotensinfreisetzung im Plasma infolge Östrogeneinwirkung.

In diesem Zusammenhang müßte entsprechend unseren Voruntersuchungen vom Östrogen auch eine Beeinflussung der Kallikreinausscheidung im Sinne einer Depression zu erwarten sein. Einen derartigen Befund konnten wir nun auch mit einer statistischen Genauigkeit von $p < 0,000$ eindeutig erbringen. Östrogen greift also aktiv in beide Systeme ein und gilt somit als mitbestimmender Faktor bei der Blutdruckregulation.

Ein weiterer erheblicher Beitrag zur Identifizierung des Aldosterons als primärer Faktor für die Regulation der Kallikreinausscheidung im Urin stammt von MARGOLIUS und Mitarbeiter (1972), die sich mit der Abhängigkeit der Kallikreinausscheidung von der Natriumzufuhr befaßten (18). Die Autoren kommen dabei zu folgendem Ergebnis:

Desoxykortikosteronapplikation führt zum Anstieg der Kallikreinausscheidung auf das Dreifache. Reduzierte Natriumzufuhr erhöht die Kallikreinausscheidung auf das Doppelte. Bei adrenaletomierten Tieren sinkt die Kallikreinausscheidung auf die Hälfte ab.

An unserem Institut konnte bei einem Fütterungsversuch mit 2 %iger Kochsalzlösung ein signifikantes Absinken der Kallikreinausscheidung verifiziert werden (21). Hierbei wurde davon ausgegangen, daß die erhöhte Natriumzufuhr eine Verminderung des Aldosteronspiegels bedingt und umgekehrt.

Auch für den Menschen ergibt sich nach GANONG (1972) eine lineare Beziehung zwischen dem reziproken Wert der Natriumzufuhr und der Aldosteronausschüttung, jedoch nur bei einer täglichen Natriumaufnahme von mindestens 50 mVal (17).

Nach manchen Hinweisen aus der Literatur werden den Kininen starke natriuretische Effekte beigemessen (5). Vermutungen, daß Kallikrein natriuretisch wirke, ließen sich im Experiment allerdings nicht bestätigen.

In unserem Diätversuch ließ sich ebenfalls eine Reduktion der Kallikreinausscheidung bei natriumarmer Spezialdiät mit statistischer Signifikanz ($p < 0,0005$) nachweisen. Der Versuch, den Einfluß einer "natriumreichen" Diät auf die Kallikreinausscheidung nachzuweisen, blieb erfolglos. Mit der Zufuhr 0,9 %iger Kochsalzlösung konnte die Kallikreinausscheidung im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht verändert werden. Es liegt der Verdacht nahe, daß die Dosis so gering ist, daß sie von den physiologischen Kompensationsmechanismen nivelliert wird.

Unser Fütterungsversuch mit natriumarmer Diät bestätigt jedoch erneut den Konnex zwischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und Kallikrein-Kinin-System, hier am Beispiel der Elektrolythomöostase.

E ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde bei weiblichen Albinoratten die Abhängigkeit der Harnkallikreinausscheidung von der Zufuhr der Substanzen Spironolacton, Propranolol und Östrogen nachgewiesen. Dabei kam es zu folgenden statistisch höchstsignifikanten ($p < 0,0005$) Ergebnissen:

1. Der Aldosteronantagonist Spironolacton bewirkt eine Depression der Harnkallikreinausscheidung.
2. Der β -Rezeptorenblocker Propranolol bewirkt ebenfalls eine Reduktion der Harnkallikreinausscheidung.
3. Das weibliche Sexualhormon Östrogen senkt gleichfalls die Harnkallikreinausscheidung.

Ergänzend wurden Fütterungsversuche mit natriumarmer und natriumreicher Diät durchgeführt mit folgenden Ergebnissen:

4. Natriumarme Diät führt zu einem statistisch höchstsignifikanten ($p < 0,0005$) Anstieg der Harnkallikreinausscheidung.
5. "Natriumreiche" Diät (Normalkost mit 0,9 %iger physiologischer Kochsalzlösung) hatte keinen Einfluß auf die Harnkallikreinausscheidung.

Diese Befunde erlauben die Schlußfolgerung, daß zwischen Renin-Angiotensin - Aldosteron-System, Elektrolythomöostase und Kallikrein-Kinin-System enge Bindungen bestehen, wobei dem Mineralokortikoid Aldosteron eine Schlüsselposition zukommt.

F LITERATURVERZEICHNIS

- 1 AHLQUIST, P.R.: Amer.J.Physiol.153 (1948), 586-600
- 2 ARMSTRONG, D., J.B.JEPSON, C.A.KEELE und J.W.STEWARD:
J.Physiol.135 (1957), 350
- 3 AUSTEN, K.F., J.SPRAGG, A.SCHREIBER und A.KAPLAN:
Vth.Int.Congr.Pharmacol.Abstr.of Invited
Presentations, San Francisco, July 23-28
(1972), 182
- 4 BACHMANN, G.W.:Beta-Sympathikolyse als therapeutisches Prin-
zip.
Kurzmonographie Sandoz Nr.7, 1972, Nürn-
berg
- 5 BARRACLOUGH, M.A. und J.H.MILLS:
Clin.Sci.28 (1965), 69
- 6 BEAVEN, V.H., I.V.PIERCE und J.J.PISANO:
Clin.Chim.Acta 32 (1971), 67
- 7 BERGMAYER, H.U.:
Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie, Weinheim, Band I, 1970
- 8 DOCUMENTA GEIGY
Wissenschaftliche Tabellen,
Geigy AG, Basel, 1960
- 9 DUBOVICNIK, W. und M.M.FORELL:
Z.Klin.Med.156 (1961), 478
- 10 EISEN, V. und W.VOGT:
Handbook of Experimental Pharmacology.
Hrgb. E.G.Erdös, Band 25
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York,
1970
- 11 ELLIOT, A.H. und F.R.NUZUMI:
Endocrinology 18 (1934), 462

- 12 ESTLER, C. J. und H. P. T. AMMON:
Biochem. Pharmacol. 15 (1966), 2031
- 13 FIEDLER, F. und E. WERLE:
Hoppe-Seylers Z. Physiol. chem. 348 (1967),
1087
- 14 FREY, E. K.: Arch. Klin. Chir. 148 (1927), 643
- 15 FREY, E. K., H. KRAUT und E. WERLE:
Kallikrein (Padutin),
Enke Verlag, Stuttgart 1950
- 16 FREY, E. K., H. KRAUT, E. WERLE, R. VOGEL, G. ZICKGRAF-
RÜDEL und L. TRAUSCHOLD:
Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhi-
bitoren,
Enke Verlag, Stuttgart 1968
- 17 GANONG, W. F.: Medizinische Physiologie,
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
1972
- 18 GELLER, R. G., H. S. MARGOLIUS, J. J. PISANO und H. R. KEISER:
Circulation Research, Vol. XXXI, December
1972
- 19 GOODMAN, L. S. und A. GILMAN:
The Pharmacological Basis of Therapeutics,
Collier Macmillan Comp., London-Toronto
1971
- 20 HABERMANN, E.: Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 328 (1962),
15
- 21 HEUTELBACH, H.: Med. Diss. München 1973
- 22 HILTON, S. M. und G. P. LEWIS:
J. Physiol. 129 (1955), 253
- 23 KAULHAUSEN, H.: Ärztl. Praxis 25 (1974), 1193
- 24 KEELE, C. A. und D. ARMSTRONG:
Substances Producing Pain and Itch,
Edward Arnold Ltd., London 1964

- 25 KIDNEY HORMONES
Hrsgb. Fischer J. W.,
Academic Press, London-New York 1971
- 26 LARAGH, J. H., L. BAER, H. R. BRUNNER, F. R. BUHLER,
J. E. SEALEY und E. D. VAUGHAN:
Amer. J. Med. 52 (1972), 633-652
- 27 LEWIS, G. P.: Handbook of Experimental Pharmacology;
Hrsgb. E. G. Erdös, Band 25,
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
1970
- 28 LEWIS, G. P. und I. MATTEWS:
Brit. J. Pharmacol. 34 (1968), 564
- 29 MALOFIEF, M.: Biochem. Pharmacol. 22 (1973), 123
- 30 MANN, K.: Gewebshormone
Schriftenreihe der Bundesapothekerkammer
zur wissenschaftlichen Fortbildung, Band IV,
Weiße Reihe 1974, S. 83-109
- 31 MARGOLIUS, H. S., R. GELLER, J. J. PISANO und A. SJOERDSMA:
Lancet (1971), 1063
- 32 MARGOLIUS, H. S., R. GELLER, W. de JONG, J. J. PISANO und
A. SJOERDSMA:
Circulation Research, Vol. XXXIII, 1972
- 33 MASHFORD, M. L. und M. L. ROBERTS:
Advanc. Exp. Med. Biol. 21 (1972), 23
- 34 MELMON, K. L., M. J. CLINE, T. HUGHES und A. S. NIES:
J. Clin. Invest. 47 (1968), 1285
- 35 MONCARDA, F., S. H. FERREIRA und J. R. VANE:
Vth. Int. Congr. Pharmacol.
Abstr. of Volunteer Papers,
San Francisco, July 23-28 (1972), 160
- 36 MORIWAKI, Ch.: Sympsoium, Mainz 1972
- 37 NASJLETTI, A. und M. E. AZZAM:
Sep. Experientia 26 (1970), 280

- 38 NUSTAD, K. und L-PUBIN:
Brit. J. Pharmacol. 40 (1970) 326-333
- 39 OATES, J. A., W. A. PETTINGER und R. B. DOCTOR:
J. Clin. Invest. 45 (1966), 173
- 40 RYAN, J. W., J. G. MOFFAT und A. G. THOMPSON:
Arch. Surg. 91 (1965), 14-24
- 41 SCHNEIDER, G.: Aufgabensammlung zur statistischen Methodenlehre.
Seminar für Statistik und Versicherungswissenschaft der Universität München,
München 1954
- 42 SIEGENTHALER, W.:
Klinische Pathophysiologie,
Thieme Verlag, Stuttgart 1970
- 43 SUMI, H., K. OKAMURA, M. MURAMATSU und S. FUJII:
Jap. Soc. Clin. Chem. 11 (1971), 240
- 44 TRAUSCHOLD, J.: Med. Habil. Schr., München 1965
- 45 TRAUSCHOLD, J. und E. WERLE:
Z. Physiol. Chem. 15 (1961), 48
- 46 TRAUSCHOLD, J., H. FRITZ und E. WERLE:
Hypotensive Peptides.
Hrsgb. E. G. Erdös,
Springer Verlag, New York 1966
- 47 VOGEL, R., L. F. GÖLDEL und M. HUTZEL:
Arzneimittelforschung 12 (1962), 885
- 48 WEBSTER, M. E. und J. P. GILMORE:
Amer. J. Physiol. 206 (1964), 714
- 49 WERLE, E.: Münchn. Med. Wschr. 7 (1973), 115
- 50 WERLE, E.: Über das Kallikrein-Kinin-System
(Vortrag in Wien 1973)

- 51 WERLE, E. und R. VOGEL:
Aus: Leistungen und Ergebnisse der neuzeitlichen Chirurgie,
Thieme Verlag, Stuttgart 1958
- 52 WERLE, E. und R. VOGEL:
Arch. Int. Pharmacodyn. 126 (1960), 171
- 53 WERLE, E., R. KEHL und K. KÖBKE:
Biochem. Z. 320 (1950), 372
- 54 WERLE, E., R. KEHL und K. KÖBKE:
Biochem. Z. 321 (1950), 213
- 55 WERLE, E., R. BUSSE und A. SCHMAL:
Sonderdruck Klin. Wochenschr., Jg. 24, 46
(1968), 1315-1317
- 56 ELLIOT, D. F., G. D. LEWIS und E. W. HORTON:
Biochem. J. 74 (1960), 15

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle danke ich für die Überlassung des Themas und die Arbeitsmöglichkeit am Institut für klinische Chemie und klinische Biochemie der Universität München.

Mein Dank gilt auch den Kollegen am Institut, die mir mit ihrem Rat zur Seite standen.

Ganz besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. Dr. H. Heutelbach für die gründliche Einführung in die Thematik sowie für die sachkundigen Hinweise zur Durchführung der Experimente.

LEBENS LAUF

Am 4. Februar 1941 wurde ich als Sohn der Eheleute Wilhelm und Josefa Blech, geb. Graf, in München geboren.

Von 1947 bis 1952 besuchte ich die Volksschule in Oberhaching bei München. Nach fünfjährigem Besuch des Progymnasiums der Salesianer in Buxheim bei Memmingen trat ich in das humanistische Theresiengymnasium in München ein, das ich im Juli 1961 mit dem Reifezeugnis verließ.

Von Oktober 1961 bis Mai 1963 leistete ich meinen Wehrdienst an der Sanitätsakademie der Bundeswehr in München ab.

Für das Sommersemester 1963 wurde ich zum Medizinstudium an der Universität München zugelassen. Im Herbst 1968 legte ich das Medizinische Staatsexamen ab und erwarb anschließend den Doktorgrad der Medizin.

Nach einjähriger Tätigkeit als Medizinalassistent an der Chirurgischen Universitätsklinik und am Kreiskrankenhaus Dachau begann ich 1969 mit dem Studium der Zahnmedizin, welches ich im Juni 1973 mit dem Staatsexamen beschloß.

Derzeit befinde ich mich in der Fachausbildung für Kieferchirurgie an der Universitätszahnklinik in München.

